

## 学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

|       |   |         |                  |
|-------|---|---------|------------------|
| 学位記番号 | 医博論第 4 2 6 号  | 学位授与年月日 | 平成 1 8 年 3 月 9 日 |
| 氏 名   | 青 枝 大 貴   |         |                  |
| 論文題目  | Expression mapping using a retroviral vector for CD8+ Tcell epitopes:<br>Definition of a Mycobacterium tuberculosis peptide presented by H2-Dd<br>(レトロウイルスベクターを用いた CD8 陽性 T 細胞エピトープの発<br>現マッピング : H2-Dd により提示される Mycobacterium tuberculosis<br>ペプチドの同定) |         |                  |

博士(医学) 青 枝 大 貴

## 論文題目

Expression mapping using a retroviral vector for CD8<sup>+</sup> T cell epitopes: Definition of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide presented by H2-D<sup>d</sup>

(レトロウイルスベクターを用いたCD8陽性T細胞エピトープの発現マッピング：H2-D<sup>d</sup>により提示される*Mycobacterium tuberculosis*ペプチドの同定)

## 論文の内容の要旨

〔はじめに〕

CD8陽性T細胞エピトープを同定することは、ワクチン投与後や微生物に感染後の抗原特異的CD8陽性T細胞の動態や機能を解析するのに必要不可欠である。これまでCD8陽性T細胞エピトープは、抗原蛋白質の全アミノ酸配列を網羅するペプチドライブラリーを用いることで同定されてきた。このペプチドライブラリーを用いる方法は有効ではあるが、抗原蛋白質の分子量が大きな場合、膨大なペプチド断片の合成が必要になり、コスト面からあまり現実的ではなく、現在でも限られた病原体の非常に少数のCD8陽性T細胞エピトープしか同定されていない。そこで、レトロウイルス発現ベクターを用いて、抗原蛋白質を直接細胞内で発現させた抗原提示細胞を用いることで、より効率的なCD8陽性T細胞エピトープの同定が可能であるかどうかを*Mycobacterium tuberculosis*の主要な分泌抗原であるMPT51をモデル抗原として検討した。

〔材料ならびに方法〕

マウスはBALB/cマウスを用いた。抗原提示細胞としては、同系マウス由来の細胞株であるP815とBW5147を用いた。MPT51をコードする遺伝子を結核菌ゲノムからクローニングし、発現プラスミドベクターpCI-MPT51を作製した。これを用いてマウスに遺伝子銃で免疫し、その脾細胞をすべての実験に用いた。MPT51を約130アミノ酸からなる3つの断片に分けるため、PCR法で各断片を増幅し、それぞれをレトロウイルスベクターにクローニングした。また、さらに詳細なエピトープの確認には20アミノ酸の断片をコードするレトロウイルスベクターを作製した。作製したレトロウイルスを用いて、それらがコードする抗原断片を発現する細胞株を樹立した。MPT51DNAワクチンで免疫したマウス脾細胞にレトロウイルスベクターを感染、発現させた抗原提示細胞を加え、24時間培養後、各抗原提示細胞に対するCD8陽性T細胞の反応を測定するため、細胞培養上清中のIFN- $\gamma$ 量をELISA法で定量した。最終的なエピトープの確認は、9アミノ酸からなる6種のペプチドを作製し、同様にこれらのペプチドに対するCD8陽性T細胞の反応をELISA法で検討した。

〔結果〕

遺伝子銃で免疫したマウス脾細胞は、MPT51全長を発現させた抗原提示細胞株にMPT51特異的な反応を示した。このことは、MPT51中にH2<sup>d</sup>拘束性のCD8陽性T細胞エピトープが存在することを示した。次に、MPT51遺伝子を3つの断片にわけ、それらが発現させた抗原提示細胞株に対する応答を同様に測定したところ、MPT51の1-140までの部分に抗原特異的な応答があった。さらに小さな領域に絞り込むため、MPT51の1-40、21-60、41-80、61-100の部分についても同様に調べたところ、1-40と21-60の部分に抗原特異的な応答を認めた。この部分をさらに20アミノ酸ずつに分けて同様に測定したが、予想に反して

全く抗原特異的な反応は見いだせなかった。そのためこの20アミノ酸部分にユビキチンを付加した融合タンパク質を発現する抗原提示細胞株を新たにレトロウイルスベクターで作製し、同様に反応を調べたところユビキチン化した21-40部分に抗原特異的な応答が認められた。アルゴリズムにより、この20アミノ酸の中の9アミノ酸からなるCD8陽性T細胞エピトープを6種類推定した。これらの合成ペプチドを用いて、MPT51中のCD8陽性T細胞エピトープは24-32であることを最終的に同定した。さらに、MHC拘束分子も同様の方法でH2-D<sup>d</sup>であることが同定できた。これらの情報をもとにテトラマーを作製したところ、MPT51特異的CD8陽性T細胞を検出できた。

#### 〔考察〕

20アミノ酸程度の短いペプチド断片は細胞内で発現させた場合、抗原提示されず、それをユビキチン化することで抗原提示を回復することが可能だった。このことは、短いペプチド断片はユビキチン化されにくく、プロテアソーム依存的な分解経路ではプロセッシングされにくいことを示唆している。細胞内抗原プロセッシングの点から非常に興味深い現象と思われる。

#### 〔結論〕

レトロウイルスベクターを用いたCD8陽性T細胞エピトープの同定法を確立した。この方法により、特に分子量の大きい抗原において、ペプチドライブラリー法より効率的にエピトープマッピングを行なうことが可能となった。

### 論文審査の結果の要旨

CD8陽性T細胞はクラスI分子に抗原ペプチドを結合した抗原提示細胞と相互作用することにより分化・成熟する。がん細胞やウイルス・細菌感染細胞の表面に発現しているクラスI結合抗原ペプチドを認識すると、これらCD8陽性T細胞はインターフェロン $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、パーフォリンなどの細胞毒性分子を放出しあるいはFas-Fas リガンドなどの細胞間相互作用により、標的細胞を傷害する。したがって、CD8陽性T細胞は腫瘍免疫、感染防御に重要な役割を果たす。CD8陽性T細胞が関与するワクチンや治療法の開発には、クラスIに結合する抗原性の高いペプチドを同定することが極めて重要である。

これまでは抗原蛋白の全アミノ酸配列を網羅するペプチドライブラリーを用いることにより、CD8陽性T細胞エピトープを決定してきた。この方法は、多くの利点を有するが、多くの時間、労力およびコストを要することが欠点であった。そのため、この方法で現在までに同定されたエピトープは極めて少ない。申請者はより効率的なエピトープ同定法を検討する目的で、レトロウイルスベクターを取り込み、抗原蛋白由来ペプチドを細胞表面に発現する抗原提示細胞を用いたマッピング法を開発した。

用いられた材料、方法は適切であった。すなわち、モデル抗原として*Mycobacterium tuberculosis*の分泌抗原であるMPT51を選んだ。遺伝子銃を用いMPT51蛋白をコードする遺伝子を発現するプラスミドベクターでBALB/cマウスを免疫し、抗原ペプチド特異的CD8陽性T細胞を誘導した。一方、MPT51DNA断片を組み込んだレトロウイルスベクターを取り込んだ培養細胞株P815、BW5147を抗原提示細胞とした。抗原エピトープの同定には、ベクターを取り込んだ抗原提示細胞でCD8陽性T細胞を含むマウス脾細胞を刺激し、IFN- $\gamma$ 産生の有無でみた。ユビキチン化ペプチドの作製もレトロウイルスベクターを用いた。最終的には、9アミノ酸からなるペプチドを合成し、CD8陽性T細胞からのIFN- $\gamma$ 産生の有無およびテトラマー

アッセイでエピトープを同定した。

得られた結果は以下の通りである。

- (1) MPT51にはH-2<sup>d</sup>拘束性のCD8陽性T細胞反応性エピトープが存在した。
- (2) MPT51遺伝子断片による検索で、このエピトープはアミノ酸残基1～140に存在した。さらに、断片を小さくして調べたところ、1～40、21～60の部分で抗原特異的免疫応答がみられた。
- (3) この部分に由来する20のアミノ酸について、IFN- $\gamma$ 産生とテトラマーアッセイで検討したところ、ユビキチン化したアミノ酸残基24～32が抗原ペプチドであった。
- (4) クラスI 拘束分子はH2-D<sup>d</sup>であった。

これらの結果から、申請者が考案したエピトープマッピング法を用いれば、癌および感染症のワクチンや治療法の開発に必要な抗原ペプチドの同定を簡便かつ効率よく行え、従来のペプチドライブラリー法にかわる方法であると思われた。また、これら所見はHLAトランスジェニックマウスによるヒトT細胞エピトープ検索の可能性も示唆した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) Ag85複合体とMPT51の相同性について
- 2) DNAワクチンについて
- 3) 遺伝子銃によるDNA免疫について
- 4) エピトープマッピングのアルゴリズムについて
- 5) ペプチド特異的T細胞の検知法について
- 6) 結核菌に対するT細胞エピトープとそれに対する反応について
- 7) P815細胞の抗原提示細胞としての機能について
- 8) レトロウイルスベクターによる抗原フラグメントの抗原提示細胞での発現について

これらの質問の対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

|         |    |   |   |   |            |
|---------|----|---|---|---|------------|
| 論文審査担当者 | 主査 | 瀧 | 川 | 雅 | 浩          |
|         | 副査 | 宮 | 本 | 愛 | 副査 千 田 金 吾 |